

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.22.005

商洛野生牛耳大黄中3种成分含量测定及影响因素研究

贾文江,李春,曹望弟,刘喜玲,李宏

(陕西省商洛市药品检验所,陕西 商洛 726000)

摘要:目的 建立测定牛耳大黄中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的高效液相色谱法,并考察生长年限及保存时间对各成分含量的影响。方法 色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-1%冰醋酸溶液(75:25, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为40℃,进样量为20 μL。结果 大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量线性范围分别为0.11~1.08 μg($r_1=0.9999$, $n=5$),0.08~0.76 μg($r_2=0.9995$, $n=5$),0.04~0.44 μg($r_3=0.9983$, $n=5$),平均加样回收率分别为98.62%,99.00%,100.28%,RSD分别为0.19%,0.10%,0.76%($n=6$);精密性、重复性、稳定性试验结果的RSD均小于2%。除1年生外,不同生长年限、不同保存时间的样品3种成分总含量无明显差异。结论 该方法简便、快捷,结果准确、可靠,可用于商洛野生牛耳大黄药材中大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量的同时测定。

关键词:牛耳大黄;高效液相色谱法;含量测定;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚

中图分类号:R932;R284.1;R282.71

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)22-0013-03

Content Determination of Three Components in the Wild *Rumex Acetosa* of Shangluo and Study on the Influencing Factors

JIA Wenjiang, LI Chun, CAO Wangdi, LIU Xiling, LI Hong

(Shangluo Pharmaceutical Inspection Institute, Shangluo, Shaanxi, China 726000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of emodin, chrysophanol and emodin methyl ether in *Rumex acetosa*, and to investigate the effect of the growth period and storage time on the content of each component. **Methods** The chromatographic column was Kromasil 100-5 C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was methanol-1% glacial acetic acid solution(75:25, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 40℃ and the sample size was 20 μL. **Results** The linear ranges of emodin, chrysophanol and emodin methyl ether were 0.11-1.08 μg($r_1=0.9999$, $n=5$), 0.08-0.76 μg($r_2=0.9995$, $n=5$), 0.04-0.44 μg($r_3=0.9983$, $n=5$), respectively. The average recoveries were 98.62%, 99.00% and 100.28%, RSDs were 0.19%, 0.10% and 0.76% ($n=6$), respectively. RSDs of precision, repeatability and stability tests were lower than 2%. Except for 1-year-old *Rumex acetosa*, there was no significant difference in the total contents of the three components in the samples with different growth years and storage time. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reliable, which can be used for the simultaneous determination of emodin, chrysophanol and emodin methyl ether in the wild *Rumex acetosa* of Shangluo.

Key words: *Rumex acetosa*; HPLC; content determination; emodin; chrysophanol; emodin methyl ether

第一作者:贾文江,男,大学本科,药师,研究方向为中药质量标准,(电子信箱)574278528@qq.com。

- [11] DABBOU S, GASCO L, ROTOLO L, et al. Effects of dietary alfalfa flavonoids on the performance, meat quality and lipid oxidation of growing rabbits[J]. Asian - Australas J Anim Sci, 2018, 31(2): 270-277.
- [12] YAMAMOTO T, NAKANO H, SHIOMI K, et al. Identification and Characterization of a Novel NADPH Oxidase 1 (Nox1) Inhibitor That Suppresses Proliferation of Colon and Stomach Cancer Cells[J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(3): 419-426.
- [13] IBI M, LIU J, ARAKAWA N, et al. Depressive - Like Behaviors Are Regulated by NOX1/NADPH Oxidase by Redox Modification of NMDA Receptor 1[J]. J Neurosci, 2017, 37(15): 4200-4212.
- [14] AL GHOULEH I, SAHOO S, MEIJLES DN, et al. Endothelial Nox1 oxidase assembly in human pulmonary arterial hypertension; driver of Gremlin1-mediated proliferation[J]. Clinical Science, 2017, 131(15): 2019-2035.
- [15] PING L, YING XL, HONG T. Muc-1 promotes migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via PI3K-Akt signaling[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10365-10374.
- [16] YASUHIRO K, AKIHISA O, YOSHIAKIRA K, et al. Germ cell - intrinsic requirement for the homeodomain transcription factor PKnox1/Prep1 in adult spermatogenesis[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0190702-709.
- [17] IWATA K, MATSUNO K, MURATA A, et al. Up-regulation of NOX1/NADPH oxidase following drug-induced myocardial injury promotes cardiac dysfunction and fibrosis[J]. Free Radic Biol and Med, 2018, 120(5): 277-288.

(收稿日期:2019-05-12)

牛耳大黄为蓼科植物皱叶酸模 *Rumex crispus* L. 的根,又名四季菜根、火风棠、羊蹄根^[1],主要化学成分为大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等,有清热凉血、化痰止咳、通便杀虫功效,临床多用于治疗急性肝炎、慢性气管炎、吐血、血崩、血小板减少性紫癜、大便燥结、痢疾、疥癣、秃疮、疔、疖等。目前的牛耳大黄药材质量标准中仅有高效液相色谱(HPLC)法测定其中大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量^[2-3]。本研究采用 HPLC 法同时测定并比较不同生长年限、不同生长时间商洛野生牛耳大黄中大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量,为全面控制其质量奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪,包括紫外检测器(日本岛津公司);SQP 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);AS30600BDT 型超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

大黄素对照品(批号为 110756-200110,含量 98.0%),大黄酚对照品(批号为 110796-201621,含量 99.2%),大黄素甲醚对照品(批号为 110758-200912,含量 99.9%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

商洛野生牛耳大黄样品,经陕西省食品药品监督管理局检验研究院郭耀武主任药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1%冰醋酸溶液(75:25, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃;进样量:20 μL。

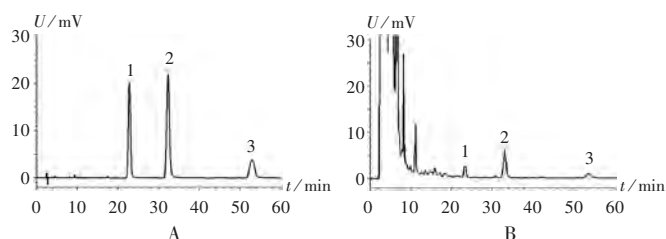
2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解并定容,制成大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为 0.054, 0.038, 0.022 mg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品粉末(过 4 号筛)2 g,精密称定,置 150 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,20 ℃ 超声(功率 250 W,频率 50 kHz)处理 30 min,冷却,以甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取上述 2 种溶液各适量,按拟订



1. 大黄素 2. 大黄酚 3. 大黄素甲醚

A 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

色谱条件进样测定,记录色谱,见图 1。结果各相邻成分间分离度较好($R > 1.5$),理论板数以大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰计均大于 3 000。

线性关系考察:取 2.2 项下混合对照品溶液,分别进样 2, 5, 10, 15, 20 μL,测定,以对照品进样量(μg)为横坐标(X)、峰面积值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程,大黄素为 $Y_1 = 38023 X_1 + 4828$ ($r_1 = 0.9999, n = 5$),大黄酚为 $Y_2 = 55124 X_2 - 163146$ ($r_2 = 0.9995, n = 5$),大黄素甲醚为 $Y_3 = 16002 X_3 + 5216.4$ ($r_3 = 0.9983, n = 5$)。结果表明,大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的进样量分别在 0.11 ~ 1.08 μg、0.08 ~ 0.76 μg、0.04 ~ 0.44 μg 范围内与峰面积值线性关系良好。

精密度试验:精密量取 2.2 项下混合对照品溶液 20 μL,按拟订色谱条件连续进样 6 次,测定。结果大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.31%, 0.45%, 0.62% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液 20 μL,室温下分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 时进样,按拟订色谱条件进样测定。结果大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 0.17%, 0.10%, 0.07% ($n = 7$),表明室温下供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品粉末(过 4 号筛)6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量,结果的 RSD 分别为 0.82%, 1.03%, 1.18% ($n = 6$),表明方法重复性较好。

加样回收试验:称取已知含量的同批次样品粉末(过 4 号筛)2.0 g,精密称定,平行 6 份,分别精密加入大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度为 0.1009, 0.0992, 0.0500 g/L 的混合对照品溶液各 3.0 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样,测定峰面积,计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

按拟订色谱条件,测定不同生长年限、不同保存时间样品的含量。结果见表 2。

表1 大黄素、大黄酚、大黄素甲醚加样回收试验结果(n=6)

取样量(g)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			\bar{X} (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
2.0015	2.0015	2.0015	0.2771	0.1795	0.1364	0.3028	0.2976	0.1500	0.5755	0.4742	0.2856	98.55	99.03	99.47						
2.0019	2.0019	2.0019	0.2772	0.1796	0.1364	0.3028	0.2976	0.1500	0.5758	0.4738	0.2872	98.61	98.86	100.53						
2.0033	2.0033	2.0033	0.2774	0.1797	0.1365	0.3028	0.2976	0.1500	0.5751	0.4743	0.2868	98.32	98.99	100.20	98.62	99.00	100.28	0.19	0.10	0.76
2.0036	2.0036	2.0036	0.2774	0.1797	0.1365	0.3028	0.2976	0.1500	0.5769	0.4748	0.2882	98.91	99.16	101.13						
2.0011	2.0011	2.0011	0.2771	0.1795	0.1364	0.3028	0.2976	0.1500	0.5758	0.4740	0.2879	98.65	98.96	101.00						
2.0019	2.0019	2.0019	0.2772	0.1796	0.1364	0.3028	0.2976	0.1500	0.5759	0.4742	0.2854	98.65	98.99	99.33						

注:A为大黄素,B为大黄酚,C为大黄素甲醚。

表2 样品中3种成分含量测定结果(mg/g, n=3)

生长年限	保存时间(月)	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
1年	2	0.0252	0.0521	0.0258
2年	2	0.1201	0.0797	0.0696
多年	2	0.1386	0.0899	0.0683
1年	14	0.0243	0.0546	0.0253
2年	14	0.1016	0.1027	0.0713
多年	14	0.1150	0.1151	0.0776

3 讨论

本研究中参考文献[4-18],分别选取加甲醇25 mL超声(功率250 W,频率50 kHz)15,30,45 min,发现超声30 min内样品提取最充分;同时分别在20℃(常温)与50℃条件下进行,结果含量无明显差异;同时考察了甲醇加热回流1 h、三氯甲烷超声提取、甲醇超声提取等方法,发现甲醇超声提取法快捷、简便、安全,故选择甲醇超声提取法。

流动相考察了甲醇与1%冰醋酸溶液不同比例(60:40,75:25,80:20, V/V)的试验结果,发现样品和对照品在以甲醇-1%冰醋酸溶液(75:25, V/V)为流动相时3个指标成分色谱峰分离度最好,理论板数最高,重复性最好,故本研究中采用甲醇-1%冰醋酸溶液(75:25, V/V)为流动相。

比较不同生长年限样品含量结果,可见,1年生的上述3种成分含量最低,2年生的比多年生的含量稍偏低;同一多年生但保存时间为14个月与2个月的样品含量比较发现,大黄素含量减少,而大黄酚含量增加,大黄素甲醚含量基本不变,三者总含量变化不大。

综上所述,该方法简便、快捷,结果准确、可靠,可用于商洛野生牛耳大黄药材中大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量的同时测定。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社, 1977:433.
[2] 王雪芹,赵祖兴,陈吉炎,等. 武当山5种土大黄中3种蒽醌类成分的含量比较[J]. 医药导报,2010,29(9):1206-1208.

[3] 邹剑成,邱小梅,王定勇. RP-HPLC法测定羊蹄根中大黄酚的含量[J]. 中药材,2009,32(7):1081-1083.
[4] 吴泽青,帅欧,陈地灵,等. 羊蹄蒽醌类成分的质控方法研究[J]. 中国现代中药,2011,13(11):36-38.
[5] 李淑娟,张力,张丹参,等. 大黄酚抗衰老作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志,2005,25(11):1362-1364.
[6] 孙晓如,周新新,朱荔,等. 中药羊蹄抑制激动剂诱导血管收缩活性成分的分离及药理活性研究[J]. 南京医科大学学报, 1999,19(6):488-490.
[7] 李磊,孙平,冯成强. 不同产地野生与栽培掌叶大黄中蒽醌类成分含量的比较[J]. 时珍国医国药,2010,21(9):2251-2253.
[8] 石荣,马越鸣,叶福媛,等. 泻心汤不同配伍中蒽醌类成分的变化研究[J]. 中草药,2007,38(9):1327-1330.
[9] 柴宝娟,李祥,陈建伟. 大黄配伍前后水解型鞣质及蒽醌类成分的含量变化研究[J]. 现代中药研究与实践,2012,26(4):27-30.
[10] 秦云,李祥,陈建伟,等. 大黄中蒽醌类成分配伍前后的量变规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):94-98.
[11] 王宾豪,杨荣平,张小梅,等. 高效液相色谱法测定决明子中蒽醌类成分的含量[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):135-136.
[12] 刘菊,白明学,张红伟,等. RP-HPLC测定助孕丸中两种蒽醌类成分的含量[J]. 中国合理用药探索,2017,14(7):63-66.
[13] 霍志鹏,王玉,张兰兰,等. 黄连-大黄合煎蒽醌类成分溶出变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):1-4.
[14] 罗学锦. 大黄甘草配伍对大黄内蒽醌类成分溶出含量的影响研究[J]. 四川中医,2017,35(1):47-49.
[15] 李平,雒佳莉,李元峰,等. 新健胃包芯片中大黄总蒽醌类成分提取因素的优化[J]. 中国当代医药,2015,22(23):4-6.
[16] 钟成,许晓峰. 炮制方法对巴戟天蒽醌类成分指纹的影响研究[J]. 中药材,2012,35(7):1249-1253.
[17] 邱小梅,邹剑成,王定勇. 羊蹄根的化学成分研究[J]. 中国药房,2009,20(9):681-683.
[18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:215.

(收稿日期:2019-04-03)